บทที่ 2 บทนำ

ในช่วงปี พ.ศ. 2548-2551 (ระยะเวลา 30 เดือน) คณะผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ให้ดำเนินการวิจัยเพื่อสร้างคลังแอนติบอดีของมนุษย์โดยจำลองแบบคลังยีนของอิมมูโนกลอบูลินส์ (immunoglobulin gene repertoire) ในร่างกายของมนุษย์ที่ระบบภูมิคุ้มกันใช้ผลิตแอนติบอดีทั้งหมด ออกมาไว้ในคลังฟาจ (phage library) ภายนอกร่างกาย (*ex vivo*) และคลังฟาจดังกล่าวมีความหลากหลายของแอนติบอดี (antibody diversity) เท่าๆ กับความหลากหลายของโมเลกุลแอนติบอดีที่มีอยู่บนผิวของเม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์ชนิดบี (B lymphocytes) ในร่างกายของมนุษย์ ทั้งนี้ด้วยการใช้เทคนิคฟาจดิสเพลย์ (phage display technology) และแอนติบอดีเอ็นจิเนียริง (antibody engineering) โดยฟาจในคลังฟาจที่สร้างขึ้นแสดง (display) โมเลกุลของแอนติบอดีของมนุษย์ที่มีความเฉพาะต่อเอพิโทป (epitopes) ต่างๆ ในรูปแบบของแอนติบอดีสายเดี่ยว [single chain variable antibody fragment (human ScFv; HuScFv)] บนผิวของฟาจและมียีนที่เป็นรหัสพันธุกรรม (encode) แอนติบอดีของมนุษย์ (human *scfv*; *huscfv*) นั้นๆ อยู่ในจีโนมของฟาจ (phage genome) ด้วย ฟาจแต่ละอนุภาค (particle) มีแอนติบอดีซึ่งมีความเฉพาะต่อเอพิโทปเพียงเอพิโทปเดียวเช่นเดียวกับ B lymphocytes ในร่างกาย โดยคณะผู้วิจัยได้สร้างคลังฟาจดังกล่าวสำเร็จและยื่นจดสิทธิบัตรในนาม วช. เป็นผู้ทรงสิทธิ์แล้วเมื่อวันที่ 22 พฤษภาคม พ.ศ. 2552 โดยได้เลขที่คำขอ 0901002288

คลังแอนติบอดีของมนุษย์ (Human antibody phage display library) ที่คณะผู้วิจัยได้สร้างขึ้นนั้นสามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือทางชีววิทยา (biological tool) สำหรับใช้ผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (HuScFv) ที่มีความเฉพาะต่อเอพิโทปใดเอพิโทปหนึ่งที่ต้องการได้โดยไม่ต้องมีการนำแอนติเจนไปกระตุ้น (immunize) ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์หรือสัตว์ให้สร้างแอนติบอดี (without *in vivo* immunization) แต่เป็นเพียงการนำแอนติเจนที่สนใจมาใช้คัดเลือกฟาจที่แสดงโมเลกุลแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (human single chain antibody; HuScFv) ที่จำเพาะกับแอนติเจนนั้นๆ ออกจากคลังฟาจ (เลียนแบบทฤษฎี clonal selection) ซึ่งจีโนมของฟาจที่ถูกคัดเลือกจะมียีนที่เก็บรหัสการสร้างโมเลกุล HuScFv ที่จับกับแอนติเจนนั้นๆ ด้วย จึงสามารถนำฟาจที่เลือกได้ไปใช้ในการผลิตโมเลกุล HuScFv ในปริมาณมากๆ ด้วยการนำฟาจไปทำให้แบคทีเรียเจ้าบ้านได้แก่ *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ที่เหมาะสมติดเชื้อ แล้วเหนี่ยวนำให้ผลิตแอนติบอดีแบบรีคอมบิแนนท์ ออกมา หรือหากต้องการก็สามารถนำยีนที่เป็นรหัสพันธุกรรมของ HuScFv ไปใส่เข้าในเซลล์ยูคาริโอติก (eukayotic cells) เช่น Chinese hamster ovarian (CHO) cells เพื่อให้ผลิต HuScFv ได้มากขึ้นโดยใช้เทคนิคของ phage transduction/electroporation, gene recombination, gene expression, protein purification และเทคนิคอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องและมีอยู่ในแล้วปัจจุบัน

แอนติบอดีสำหรับรักษาโรคในมนุษย์ (Human therapeutic antibodies) ที่ผลิตจากคลังฟาจ ดังกล่าวจะช่วยลดข้อจำกัดต่างๆ ที่ประสบอยู่ในกระบวนการผลิตและการใช้แอนติบอดีจากสัตว์ในการรักษาโรคในมนุษย์ซึ่งแต่ก่อนต้องกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ (animal immunization) ด้วยอิมมูโนเจน (immunogen) นอกจากนี้ยังช่วยลดระยะเวลาการผลิตเพราะไม่ต้องรอเวลาให้ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายสร้างแอนติบอดีออกมาถึงระดับที่ต้องการ ซึ่งโดยปกติใช้เวลาหลายเดือนหรือนานเป็นปี ไม่ต้องมีสถานที่และคนเลี้ยง/รักษาสัตว์ ลดแรงงาน และลดค่าใช้จ่าย รวมทั้งสามารถผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนบางชนิดที่ผลิตด้วยการ immunize สัตว์ได้ยาก เช่น ในกรณีที่แอนติเจนมีความเป็นพิษสูง (เช่น พิษจากแบคทีเรีย และพิษจากสัตว์ต่างๆ ที่โมเลกุลเล็ก) แอนติเจนที่มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันน้อย (low immunogenicity) รวมทั้ง haptens ซึ่งแต่ละโมเลกุลมี B cell epitope เพียง epitope เดียวและไม่มี T cell epitope และไม่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้เอง เช่นสารพิษ tetrotodotoxin (TTX) จากปลาปักเป้าที่มีขนาดโมเลกุลเพียง ~320 Daltons (Da) เป็นต้น นอกจากนี้ยังลดปัญหาที่ตามมาจากการใช้แอนติบอดีของสัตว์ในการรักษาโรคของมนุษย์ เช่น ปฏิกริยาภูมิไวเกินต่างๆ (hypersensitivity: serum sickness, anaphylaxis) เป็นต้น ทั้งนี้เพราะแอนติบอดีที่ผลิตจากคลังฟาจที่สร้างขึ้นเป็นโมเลกุลโปรตีนพวกอิมมูโนกลอบูลินส์ของมนุษย์โดยสมบูรณ์ จึงไม่เป็นสิ่งแปลกปลอมในมนุษย์ (allologous/homologous protein) รวมทั้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรักษา เพราะแอนติบอดีที่สร้างขึ้นเป็นโมเลกุลเล็ก (Single chain variable fragments; ScFv; MW ~25-35 kDa) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าแอนติบอดีปกติ (IgG; MW 150 kDa) ประมาณ 5 เท่า จึงสามารถแทรกเข้าไปทำงานในเนื้อเยื่อได้ดีกว่าแอนติบอดีปกติ นอกจากนี้ยังไม่ก่อให้เกิดการอักเสบ (เพราะ HuScFv ไม่มีส่วน Fc) อีกด้วย แอนติบอดีชนิดสายเดี่ยวของมนุษย์จากแต่ละ recombinant clone มีคุณภาพที่แน่นอน ไม่มี batch-to-batch variation เหมือนการผลิตแอนติบอดีจากสัตว์แต่ละตัวหรือคนแต่ละคน และปลอดจาก *in vivo* immune regulation และ genetic variation ของโฮสท์

ในการดำเนินการวิจัยเพื่อการสร้างคลังแอนติบอดีของมนุษย์ดังกล่าว คณะผู้วิจัยได้นำ B lymphocytes ที่ทำหน้าที่ผลิตโมเลกุลแอนติบอดี จากเลือดดำของผู้บริจาคเลือดชาวไทยจำนวนมากถึง 60 คน มาสกัด total RNA แล้วเตรียม mRNA และ cDNA ตามลำดับ จากนั้นใช้ cDNA เป็น templates ในการเพิ่มปริมาณยีนที่ปืนรหัสของ VH และ VL ทั้งหมดด้วย polymerase chain reaction (PCR) (โดยใช้ degenerate และ non-degenerate primers ที่ออกแบบให้ครอบคลุมการเพิ่มปริมาณยีนที่เป็นรหัสพันธุกรรมของ VH และ VL antibody domains ของมนุษย์ทุก family) แล้วนำ amplified *VH* และ *VL* sequences เหล่านั้นไปเชื่อมต่อกันด้วย polynucleotide linker ที่ความยาวเหมาะสม ให้เป็น *huscfv* gene sequences โดยเทคนิค spliced overlapped extension-PCR (SOE-PCR) จากนั้น *huscfv* เหล่านี้ถูกนำไปเชื่อมต่อกับยีนที่เป็นรหัสของ coat protein ชื่อ PIII ของ filamentous phage ชนิด M13 (*p3*) ใน phagemid vector ที่จำเพาะ เพื่อสร้าง recombinant phagemids ที่ *huscfv* genes ถูก

inserted อยู่ใน phage genome หลังจากการทำ phage rescue ด้วยการ co-transfect *E. coli* ด้วย recombinant phagemids พร้อมๆ กับ helper phage ให้ได้ complete (mature) phage particles แล้ว ฟาจแต่ละอนุภาคที่มี *huscfv* ในจีโนม จะมีโมเลกุล human single chain variable fragments (HuScFv) ซึ่งเป็น phenotype ของ *huscfv* นั้นๆ ปรากฏ (display) อยู่บนผิวของฟาจในรูปแบบของ HuScFv-P_3(PIII) fusion protein ด้วย

คลังฟาจแอนติบอดีของมนุษย์ (Human antibody phage library) ที่คณะผู้วิจัยได้สร้างไว้ได้ถูกนำไปใช้ทดลองผลิตโมเลกุล HuScFv ต่อพิษงูเห่าไทยเป็นต้นแบบ โดยใช้พิษงูเห่าไทยทั้งหมด (whole venom) และส่วนประกอบย่อยของพิษงูเห่า (venom components) เป็นแอนติเจนในการคัดเลือกฟาจในคลังแอนติบอดีด้วยวิธี bio-panning และ phage rescue หลังจากที่ได้กลุ่มฟาจที่แสดงโมเลกุล HuScFv ที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าไทยและส่วนประกอบย่อยแล้ว ได้นำฟาจดังกล่าวแต่ละ clone ไป infect non-suppressor *E. coli* (สายพันธุ์พิเศษที่สามารถอ่านรหัสของ stop codon ที่ผู้วิจัยใส่ไว้ระหว่าง *huscfv* และ *p3* sequences ใน phagemid และจะสร้างเฉพาะ soluble HuScFv โดยไม่มี phage coat protein PIII ติดอยู่) ให้ผลิต soluble HuScFv ในปริมาณมากๆ ด้วยการนำ transformed *E. coli* ไปเลี้ยง ใน culture medium แล้ว induced ให้ผลิต soluble HuScFv จากนั้นได้นำ soluble HuScFv ไป purified และ ทดสอบคุณสมบัติในการลบล้างความเป็นพิษของพิษงูเห่าไทยในสัตว์ทดลองโดยใช้ HuScFv จาก phage แต่ละ clone และ HuScFv cocktails พบว่าสามารถลบล้างความเป็นพิษของพิษงูเห่าไทยได้ดี

Human antibody phage library, Human ScFv, transformed *E. coli* ที่ carry *huscfv*-phagemids และผลผลิตต่างๆ จากงานวิจัยของปีงบประมาณ พ.ศ. 2548-2551 นอกจากจะได้ดำเนินการยื่นขอจดสิทธิบัตรในนามของ วช. ไว้แล้ว ยังได้ตีพิมพ์ผลงานแล้ว ได้แก่

1. Kulkeaw K, Chaicumpa W, Sakolvaree Y, Tongtawe P, Tapchaisri P. Proteome and immunome of the venom of the Thai cobra, *Naja kaouthia*. *Toxicon* 2007; 49: 1026-41.
2. Kulkeaw K, Sakolvaree Y, Srimanote P, Tongtawe P, Maneewatch S, Sookroong N, Tungtrongchitr A, Tapchaisri P, Kurazono H, Chaicumpa W. Human monoclonal ScFv neutralize lethal Thai cobra, *Naja kaouthia*, neurotoxin. *J Proteomics* 2009; 72(2): 270-82.

สำหรับโครงการวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติในปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 นี้เป็นโครงการต่อเนื่องจากโครงการใหญ่เรื่อง "การสร้างคลังแอนติบอดีของมนุษย์โดยใช้เทคนิคฟาจดิสเพลย์ฯ" ที่ดำเนินการไปแล้วใน 30 เดือนแรกดังกล่าวแล้ว โดยในปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 นี้จะนำ human antibody phage library ที่สร้างไว้ ไปใช้เป็น biological tool เพื่อผลิต therapeutic antibodies ต่อสารพิษจากทะเล (marine toxins) คือสารพิษ tetrodotoxins (TTX) ของปลาปักเป้า (Puffer fish) ที่จับมาจากทะเลของประเทศไทย ซึ่งสารพิษเหล่านี้ทำให้เกิดความ

เจ็บป่วยในผู้บริโภคปลาปักเป้าหรืออาหารทะเลอื่นที่มีสารพิษปนเปื้อนอยู่เนืองๆ ทั้งในประเทศไทย และประเทศอื่นๆ และยังไม่มี antidote สำหรับลบล้างพิษ tetrodotoxin